



(19)

(11) Publication number:

6

Generated Document.

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN(21) Application number: **60273382**(51) Intl. Cl.: **A01N 63/02**(22) Application date: **06.12.85**

<p>(30) Priority:</p> <p>(43) Date of application publication: 18.06.87</p> <p>(84) Designated contracting states:</p>	<p>(71) Applicant: OJI PAPER CO LTD</p> <p>(72) Inventor: KONDO EIZO ISHIBASHI NOBUYOSH SHIBATA MASARU KAWASAKI SEIJI ITO MASAKI</p> <p>(74) Representative:</p>
---	--

**(54) MULTIPLICATION OF
INSECT-PARASITIC
NEMATODE**

(57) Abstract:

PURPOSE: To remarkably improve multiplication ratio and infective power on insects, lead insects to onset and death, and safely and effectively use the nematodes as a biological and agricultural chemical, by using a culture medium containing the intestines of domestic fowls as a culture medium for artificially multiplying an insect-parasitic nematode.

CONSTITUTION: An insect-parasitic nematode is multiplied by using a culture medium containing the intestines of domestic fowls, e.g. chicken, duck, quail, turkey, etc., as a culture medium for artificially multiplying the insect-parasitic nematode. The intestines to be used are preferably used by washing and

removing the contents thereof.
Preferred examples of the insect-parasitic nematode to be used include nematodes of the genera Neoaplectana and heterorhabditis of the order Rhabditida. The infected form larvae are attracted to gaseous carbon dioxide, etc., evolved from insects, invade from, e.g. mouth parts, to break the intestinal wall, enter the hemocoel, release and multiply symbiotic bacteria and cause septicemia and kill insects.

COPYRIGHT: (C)1987,JPO&Japio

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-135402

⑤ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)6月18日

A 01 N 63/02

7144-4H

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 昆虫寄生性線虫の増殖法

⑯ 特 願 昭60-273382

⑰ 出 願 昭60(1985)12月6日

⑱ 発明者	近 藤 栄 造	佐賀市日の出1-18-35-34
⑱ 発明者	石 橋 信義	佐賀市金立町大字千布1090-3
⑱ 発明者	柴 田 勝	亀山市井尻町313番地の8
⑱ 発明者	川 崎 政治	鈴鹿市庄野町1276-4
⑱ 発明者	伊 藤 昌 樹	亀山市井尻町313番地の8
⑲ 出 願 人	王子製紙株式会社	東京都中央区銀座4丁目7番5号
⑳ 代 理 人	弁理士 中 本 宏	外2名

明 細 書

1. 発明の名称

昆虫寄生性線虫の増殖法

2. 特許請求の範囲

1. 昆虫寄生性線虫を人工増殖するための培地として家禽類の腸を含む培地を使用することを特徴とする昆虫寄生性線虫の増殖法。
2. 腸の内容物を洗浄除去して調整した培地を使用する特許請求の範囲第1項記載の増殖法。
3. 昆虫寄生性線虫が *Neaplectana* spp. である特許請求の範囲第1項記載の増殖法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、昆虫寄生性線虫の増殖法に関するものである。

(技術的背景)

昆虫寄生性線虫である *Neaplectana* spp. は、食糞性害虫、穿孔性害虫あるいは土壌害虫等実験的には250種に及び昆虫に感染してこれらを殺虫する能力を持っている(「遺伝」第37

巻第6号(1985年)第31~35頁。「植物防疫」第38巻第3号(1984年)第44~49頁)。このような線虫を殺虫剤として利用することは極めて有効な方法である。

例えば、合成農薬等を連用していると、殺虫効果が高い一方、昆虫の薬剤抵抗性を促進することになるため、殺虫剤の使用量を増加しなければその効力を失うことになる。その点、線虫のような生物農薬を使用する場合は、たとえ殺虫効果が若干劣るとしても、長期的に見た場合は合成農薬のような危険性はなく、ひいては人類の生命への危険性も全くない。

これらの線虫は4~5日で世代を繰り返すが、この途中で食物不足とか過密状態等の不良環境に会うと感染態幼虫と言う特殊な形態になる。この幼虫は無摂食であるにもかかわらず活発に運動して、対象昆虫の口、肛門あるいは気門から体内に侵入し、さらに腸壁等を通つて血体腔へ達すると、線虫体内に保持されていた病原性の共生細菌が放出され、昆虫に敗血症を発病さ

せて死に至らせる。

このような線虫の増殖方法は、

- (1) 昆虫体内での増殖法
- (2) ドッグフード培地での増殖法
- (3) スポンジ培地での増殖法

等がある。

方法(1)は線虫の感染によつて死んだ昆虫体内で増殖した線虫を回収するものである。方法(2)は、市販のドッグフードを粉状にして寒天液を加えた後加熱滅菌してペースト状にする。ここへ感染型幼虫を接種して増殖させる方法である。また方法(3)は、最も安価で効率的といわれるもので、豚、羊の心臓、肝臓、ニワトリの心臓、或いは羊、豚、牛の腎臓等をジュースにしてポリウレタンスポンジにしみ込ませ、ここで線虫を増殖させる方法である。

上記3つの方法のうち、(3)の方法が、現在実用化されているが(「植物防疫」第38巻第3号(1984年)第44~49頁。特開昭52-41225号公報)、更に効率的で安価な方

法が求められている。

本発明者らは、特開昭52-41225号公報(USP. 4,178,366号、USP. 4,354,498号明細書に対応)で提案されているように線虫の飼料としてニワトリ(ブロイラーも含む)、羊、牛あるいは豚等の心臓、肝臓さらには腎臓等の臓器を単独に、あるいは組み合わせて使用する方法について詳細に検討し、さらに有効な方法の探索を行つた。その結果、ニワトリ、アヒル、ウズラ、七面鳥等の家禽類の腸を~~含む~~昆虫寄生性線虫の増殖に供する培地として使用することが、従来行われてきたニワトリ、羊、牛、豚等の心臓、肝臓、腎臓等よりも驚くべき増殖効果をもたらすことを見いだして本発明を完成するに至つた。

(本発明の構成)

本発明は昆虫寄生性線虫を人工増殖するための培地として家禽類の腸を主成分とする培地を使用する昆虫寄生性線虫の増殖法である。

つぎに、本発明で用いる昆虫寄生性線虫及び

家禽類の腸について詳しく説明する。

昆虫寄生性線虫(殺虫性線虫)

本発明で使用する昆虫寄生性線虫として好ましいのはRhabditida目のNeaplectana属とHeterorhabditis属の線虫である。本線虫の感染型幼虫は昆虫から発散される炭酸ガスや排泄物に含まれる尿酸やアルギニンなどに誘引されて、昆虫の口器、気門、肛門または、脚の関節部分から侵入する。例えば、口器から侵入した感染型幼虫は中腸の腸壁を破つて血体腔に入り、ここで腸内に保持していた共生細菌(例えば、*N. carpocapsae* は、*Xenorhabdus nematophilus*)を放出する。共生細菌は急速に増殖して昆虫に敗血症を起こさせ、ほとんどの昆虫は2日以内に死亡させられる。

細菌にはI型(primary form)とII型(secondary form)があり、このI型は病原性が強くまた線虫の繁殖にもよい。従つて、I型を線虫に保持させておくことが殺虫効果を高めるための鍵となる。

家禽類の腸

家禽類としてはニワトリ、アヒル、ウズラ、七面鳥等があり、一例としてニワトリ(ブロイラーを含む)の腸を使用することが好ましい。腸はその内容物を洗浄除去したものを使用することが一層好ましい。

以下実施例によつて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1.

1) 供試線虫

Neaplectana carpocapsae のDD-136系を使用した。なお実験精度を高めるために一頭の抱卵雌成虫から増殖させた線虫を供試することにより材料の生理的條件を均一にした。

2) 培地の調整

-30℃で凍結保存しておいた新鮮なニワトリ(ブロイラー)の肝臓および腸を解凍して供試した。また、腸についてはその内容物を洗浄除去したものと洗浄しないものの二種

類を用いた。

これら臓器のそれぞれ1kg当りに250 mlの温水(約50℃)を加え、家庭用ミキサーで1分間摩砕してジュース状にしたものあるいは混合したものを1cm以下に細切りしたポリウレタンスポンジ200gに吸収させた。これら培地を、直径1.8cm、長さ1.8cmの試験管および直径6cm、厚さ1.5cmのペトリ皿へは夫々10gずつ、直径9cm、厚さ2cmのペトリ皿へは20g入れた後、オートクレーブで殺菌(120℃、20分)した。

3) 線虫の接種と調査法

0.1%ホルマリン液で5回予備洗浄した感染懸幼虫を、0.1%メルチオレートで3時間表面殺菌したのち滅菌水で3回洗浄した。マイクロピペットを使用して培地に200頭接種した後、25℃で培養した。一定日数培養後ペールマン法で分離して、ピーターの1ml計数盤で計数した。

4) 結果

はかなり多くなる。とくに、感染懸幼虫は、腸の添加率0および50%では100万頭/試験管程度であるが、90および100%になると約2倍の200万頭/試験管になり、腸を多く使用した培地での線虫の増殖方法は著しく有効であることが判明した。

さらに、前記と同様に腸の内容物を洗浄除去して調整した培地(洗浄培地)と洗浄しないで調整した培地(非洗浄培地)を試験管に入れ、同様に線虫を接種して培養した。そして、洗浄培地での総線虫数および非洗浄培地で増殖した線虫数と洗浄培地で増殖した線虫の比率を表-2に示す。

結果を表-1に示す。

表-1 肝臓に腸を各種の割合で添加した培地での線虫の増殖数

腸の添加率 (%)	接種後 の日数 (日)	線虫数(×10 ⁶ 頭/試験管)		
		感染懸幼虫	その他幼虫 および成虫	総数
0	20	0.53	1.15	1.68
	40	0.94	0.50	1.24
50	20	0.62	0.79	1.41
	40	0.79	0.97	1.76
90	20	0.65	0.94	1.59
	40	1.94	0.21	2.15
100	20	0.35	0.53	0.88
	40	1.88	0.47	2.35

表-1に示した結果は肝臓に腸(非洗浄)を混ぜ合わせた培地に線虫を接種した場合、20日と40日後における増殖した線虫数を表す。接種後20日目では、むしろ腸の添加率の多いほうが、線虫数は少ないが反対に40日目になると腸の添加率の多いほうが線虫数

表-2 洗浄培地での線虫の比率

接種後 の日数 (日)	洗浄培地での 総線虫数 (頭/試験管)		非洗浄培地に対する 非洗浄培地の線虫数の比率		成虫
	総線虫数	感染懸幼虫	感染懸幼虫	その他の幼虫	
5	74	1.16	1.15	0.77	3.67
10	0.61×10 ⁶	3.81	0.27	3.01	2.551
15	3.1×10 ⁶	4.248	1.28	4.5.61	4.409
20	1.7×10 ⁶	2.35	1.19	2.12	4.75
25	5.0×10 ⁶	1.60	2.04	1.35	0.75
30	4.0×10 ⁶	1.19	1.35	0.50	0.29

表-2に示した結果によれば、腸の内容物を洗浄除去して調整した培地(洗浄腸培地)におけるほうが洗浄しないで調整した培地(非洗浄腸培地)におけるよりもさらに線虫の総数も感染態幼虫数も多いことが判明した。例えば、接種後25日目では、洗浄腸培地は、非洗浄腸培地に比べて約2倍の感染態幼虫の増殖率を示した。これはまさに驚くべきことであつた。

実施例2

供試線虫あるいは培地の調整法は、実施例1の場合と同様にして、培養容器の違いによる線虫の増殖状態を調べた。結果を表-3に示す。

表-3 増殖容器のちがいによる線虫の増殖数

培地	容器	増殖量10g当たりに増殖した 線虫数($\times 10^4$ 頭)	
		総数	感染態幼虫
肝臓	試験管	125	90
	ペトリ皿(6cm)	202	191
	ペトリ皿(9cm)	234	208
腸	試験管	198	136
	ペトリ皿(6cm)	422	404
	ペトリ皿(9cm)	572	481

* 試験管およびペトリ皿(6cm)には10g、ペトリ皿(9cm)には20gの培地を入れたが、結果は10g当たりに換算した値を示した。

* DD-136を200頭接種後、30日。

この結果によれば肝臓および腸から調整した両培地ともに、試験管(直径1.8cm、長さ18cm)、ペトリ皿(直径6cm、厚さ1.5cm)、ペトリ皿(直径9cm、厚さ2cm)の順に感染態幼

虫の出現数は増加した。

すなわち、肝臓を使用した場合、ペトリ皿9cmでは試験管の約2倍の、さらに腸の場合では約3倍の増殖数を示した。この結果から、線虫の増殖容器としては試験管よりもペトリ皿が有効であり、さらにペトリ皿でも大きいほうが有効であることが明らかにされた。このような現象の理由としては酸素供給量に関係しているものと考えられる。

実施例3

実施例1のニワトリの腸で増殖した昆虫寄生性線虫の病原性を調査した。

病原性の調査法

病原性を調査した線虫は、*Neosaplectana carpocapae*のDD-136系とMexican系、*N. bibionis*、*N. glaseri*そして*Heterorhabditis* spp.の5種とした。また、病原性判定用昆虫としてコガネムシ、カブラヤガ、ハチミツガの各終齢幼虫を用いた。

それぞれの線虫をコガネムシとカブラヤガに

は1頭あたり2500頭を、ハチミツガには500頭を接種して25℃の温度下に置いて、昆虫の死亡数を調べた。

結果を表-4に示したが、*Heterorhabditis* spp.はやや病原性が低い、その他のものは高い効果を示した。

表-4 ニワトリの腸で増殖した
線虫の病原性調査結果

	死 虫 率 (%)		
	コガネムシ	カブラヤガ	ハチミツガ
DD-136	60	93	97
Mexican	60	93	100
<i>N. bibionis</i>	60	93	100
<i>N. glaseri</i>	87	100	97
<i>Heterorhabditis</i>	30	27	10
無 処 理	10	7	3

なお、上記各実施例においては、ニワトリの腸或いはニワトリの腸と肝臓の混合培地を使用

したが、ニワトリの肝臓の代りに豚、羊、牛の心臓、肝臓、腎臓あるいはニワトリの心臓を用いた場合にも同様の結果が得られた。

〔発明の効果〕

以上説明した如く、家禽類の腸を含む培地を使用することにより線虫の増殖率は著しく向上し、昆虫類に対する感染力も良好であるため、生物農薬の大量生産への道を開くものである。

さらに本発明者らは、先の特願昭59-116522号に示すごとく、殺虫性線虫をパーク堆肥に担持させた土壌改良剤として使用することにより優れた効果が得られることを見い出しているが、本発明により増殖した線虫もまた、パーク堆肥等の発酵堆肥と併用することにより効果が向上することはいうまでもない。

特許出願人 王子製紙株式会社

代理人 中 本 宏

同 井 上 昭

同 吉 嶺 桂